VISIT…

LANZAROTE Caliente.COM

ФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Методы анализа, основанные на поглощении электромагнитного излучения анализируемыми веществами, составляют обширную группу абсорбционных оптических методов. При поглощении света атомы и молекулы анализируемых веществ переходят в новое возбужденное состояние. В зависимости от вида поглощающих частиц и способа трансформирования поглощенной энергии различают:

1. Атомно-абсорбционный анализ, основанный на поглощении световой энергии атомами анализируемых веществ.

2. Молекулярный абсорбционный анализ, т.е. анализ поглощения света молекулами анализируемого вещества в ультрафиолетовой, видимой и инфракрасной областях спектра (спетрофотометрия, фотоколориметрия, ИК-спектроскопия).

3. Анализ поглощения и рассеяния световой энергии взвешенными частицами анализируемого вещества **(турбидиметрия, нефелометрия)**.

4. Люминесцентный (флуорометрический) анализ, основанный на измерении излучения, возникающего в результате выделения энергии возбужденными молекулами анализируемого вещества.

Все эти методы иногда объединяют в одну группу спектрохимических или спектроскопических методов анализа, хотя они и имеют существенные различия. *Фотоколориметрия* и *спектрофотометрия* основаны на взаимодействии излучения с однородными системами, и их обычно объединяют в одну группу ***фотометрических методов анализа.***

В фотометрических методах используют избирательное поглощение света молекулами анализируемого вещества. Согласно квантовой механике свет представляет собой поток частиц, называемых квантами или фотонами. Энергия каждого кванта определяется длиной волны излучения. В результате поглощения излучения молекула поглощающего вещества переходит из основного состояния с минимальной энергией E_1 в более высокое энергетическое состояние E_2. Электронные переходы, вызванные поглощением строго определенных квантов световой энергии, характеризуются наличием строго определенных полос поглощения в электронных спектрах поглощающих молекул. Причем поглощение света происходит только в том случае, когда энергия поглощаемого кванта совпадает с разностью энергий ΔE между квантовыми энергетическими уровнями в конечном (E_2) и начальном (E_1) состояниях поглощающей молекулы:

$$h\nu = \Delta E = E_2 - E_1$$

Здесь h – постоянная Планка ($h = 6{,}625 \times 10^{-34}$ Дж•с); ν – частота поглощаемого излучения, которая определяется энергией поглощенного кванта и выражается отношением скорости распространения излучения *c* (скорости световой волны в вакууме $c = 3 \times 10^{10}$ см/с) к длине волны λ; $\nu = c/\lambda$. Частота излучения ν измеряется в обратных секундах ($с^{-1}$), герцах (Гц). 1 Гц = 1 $с^{-1}$.

Длина волны λ измеряется в ангстремах (1 Å = 1×10^{-8} см), микрометрах или микронах (1 мкм = 1 мк = 1×10^{-6} м), нанометрах или миллимикронах (1 нм = 1 ммк = 10 Å = 1×10^{-9} м).

Энергия излучения характеризуется электромагнитным спектром, охватывающим область от километровых радиоволн до десятых долей ангстрема γ-излучения и космических лучей. Для характеристики участка спектра часто исполь-

зуют также волновое число θ, которое показывает, какое число длин волн приходится на 1см пути излучения в вакууме, и определяется соотношением: $\theta = 1/\lambda$.

Природа полос поглощения в ультрафиолетовой (10–400нм) и видимой (400–760нм) областях спектра одинакова и связана главным образом с числом и расположением электронов в поглощающих молекулах и ионах. В инфракрасной области (0,8–1000 мкм) она в большей степени связана с колебаниями атомов в молекулах поглощающего вещества.

В зависимости от используемой аппаратуры в фотометрическом анализе различают *спектрофотометрический* метод – анализ по поглощению монохроматического света и *фотоколориметрический* – анализ по поглощению полихроматического (немонохроматического) света в видимой области спектра. Оба метода основаны на пропорциональной зависимости между светопоглощением и концентрацией поглощающего вещества.

Фотометрические методы подразделяют на прямые и косвенные. В прямых методах определяемый ион M с помощью реагента R переводят в светопоглощающее соединение MR, а затем измеряют интенсивность светопоглощения раствора этого соединения. При косвенных определениях используют вспомогательные соединения, которые при взаимодействии с определяемым веществом либо разрушаются сами, либо образуют новые светопоглощающие соединения.

Основные закономерности светопоглощения.

При прохождении через слой вещества (раствора) светового потока с интенсивностью I_0 его интенсивность в результате поглощения в слое, отражения и рассеяния уменьшается до значения I. Интенсивности падающего светового потока I_0 и светового потока I, прошедшего через раствор, можно определить экспериментально. При относительных измерениях поглощения света истинными растворами потерями излучения вследствие отражения и рассеяния обычно пренебрегают.

Связь между интенсивностями световых потоков I_0 и I устанавливается законом Бугера-Ламберта, согласно которому *однородные слои одного и того же вещества одинаковой толщины поглощают одну и ту же долю падающей на них световой энергии (при постоянной концентрации растворенного вещества)*.

Математически этот закон выражается уравнением экспоненциальной зависимости:

$$I = I_0 e^{al} \quad (1),$$

где e – основание натуральных логарифмов; a – коэффициент поглощения; l – толщина поглощающего слоя.

Отношение:

$$T = I/I_0$$

называют *пропусканием*; его значения могут изменяться от 0 до 1. Часто эту величину выражают в процентах. Если величина T отнесена к толщине слоя в 1 см, то ее называют *коэффициентом пропускания*. Поглощение излучения характеризуют *оптической плотностью*:

$$A = \lg(I_0/I) = -\lg T$$

Связь между концентрацией поглощающего раствора и его оптической плотностью $\lg(I_0/I)$ выражается законом Бера, согласно которому *оптическая плотность раствора прямо пропорциональна концентрации растворенного вещества при по-*

стоянной толщине слоя:

$$Lg(I_0/I) = k_1C \quad (2)$$

где k_1 – коэффициент пропорциональности; C – концентрация растворенного вещества. Зависимость интенсивности монохроматического светового потока, прошедшего через слой окрашенного раствора, от интенсивности падающего потока света, концентрации окрашенного вещества и толщины слоя раствора определяется объединенным законом Бугера-Ламберта-Бера, который является основным законом светопоглощения и лежит в основе большинства фотометрических методов анализа:

$$I = I_0 \times 10^{-kCl} \quad (3)$$

где k – коэффициент светопоглощения, зависящий от природы растворенного вещества, температуры, растворителя и длины волны света.

Если концентрация C выражена в молях на литр, а l – в сантиметрах, то k представляет собой *молярный коэффициент светопоглощения* при длине λ и обозначается ε_λ. В таком случае уравнение примет вид:

$$I = I_0 \times 10^{-\varepsilon_\lambda Cl} \quad (4)$$

При соблюдении основного закона светопоглощения оптическая плотность раствора прямо пропорциональна молярному коэффициенту светопоглощения, концентрации поглощающего вещества и толщине слоя раствора:

$$A = \varepsilon_\lambda Cl \quad (5)$$

При графическом изображении зависимости оптической плотности от концентрации (при постоянном значении l) получается прямая линия. Эта прямая проходит через начало координат при отсутствии поглощения света растворителем и систематических погрешностей.

Уравнения 4 и 5 выведены для монохроматического света, т.е. света определенной длины волны, который может быть выделен при помощи специального оптического устройства – монохроматора. В фотоколориметре измерение интенсивности световых потоков производят не в монохроматическом, а в полихроматическом свете, т.е. на довольно широком участке спектра – в интервале длин волн 20–100 нм. В этом случае в уравнении 5 вместо молярного коэффициента светового поглощения ε_λ. можно использовать значение среднего молярного коэффициента светопоглощения ($\varepsilon_{ср}$), зависящие от ширины полосы пропускания светофильтра ($\varepsilon_{ср} < \varepsilon_\lambda$).

Спектры поглощения

Спектр поглощения, или, более корректно, абсолютный спектр поглощения вещества представляет собой зависимость количества поглощенного света от длины волны. Такие спектры для красителей в видимой области (400–700 нм) имеют иногда несколько максимумов. Спектры поглощения в ультрафиолетовой (200–400 нм) и видимых областях отражают переходы связанных и несвязанных электронов в молекуле. Это обычно делокализованные π-электроны двойных C=C связей и неподеленные пары азота и кислорода. Поскольку, как правило, все электроны в молекуле при комнатной температуре находятся на нижнем энергетическом уровне, спектры в этой области дают информацию об основном и первом возбужденном электронных состояниях молекулы. Ввиду того, что длина волны поглощенного света соответствует определенному переходу, пики на спектрах поглощения вещества обусловлены присутствием в нем известных структур. Длина волны, при которой

наблюдается максимальное поглощение света, обозначается через $\lambda_{макс}$. Положение максимума спектра поглощения является важной оптической характеристикой вещества, а характер и вид спектра поглощения характеризуют его качественную индивидуальность. Группа в молекуле, которая дает вклад в спектр ее поглощения, называется *хромофором.* Такой группой является, например, карбонильная группа >C=O, существующая у всех аминокислот. Другим хромофором является пептидная группа полипептидных цепей. К основным хромофорам белка относятся остатки ароматических кислот: триптофан и в меньшей степени тирозин и фенилаланин. Спектр поглощения триптофана, обусловленный его индольным кольцом с системой сопряженных связей, обладает двумя полосами поглощения с максимумами при 220 и 280 нм. В нуклеиновых кислотах основными хромофорами являются пуриновые и пиримидиновые азотистые основания нуклеотидов. При образовании сопряженных связей в молекуле энергия возбужденного состояния электронов уменьшается, и, следовательно, хромофор начинает поглощать свет большей длины волны. Такой сдвиг в спектрах поглощения называется *батохромным.* Наоборот, сдвиг спектра в коротковолновую область именуется *гипсохромным. Гиперхромный* и *гипохромный* эффекты – это соответственно увеличение и уменьшение экстинкции. Обнаружить очень близко расположенные линии колебательных и вращательных переходов на спектрах молекул удается лишь при высоком *разрешении* (разрешением называется способность прибора различать две близко расположенные линии).

ФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ВЕЩЕСТВА В РАСТВОРЕ.

Фотометрические методы определения концентрации растворов основаны на сравнении поглощения при пропускании света стандартными и исследуемыми растворами. Степень поглощения света фотометрируемым раствором измеряют с помощью фотоколориметров и спектрофотометров. Измерение оптической плотности стандартного и исследуемого окрашенных растворов всегда производят по отношению к раствору сравнения (нулевому (контрольному) раствору). В качестве раствора сравнения можно использовать аликвотную часть исследуемого раствора, содержащего все добавленные компоненты, кроме реагента, образующего с определяемым веществом окрашенное соединение. Если добавляемый реагент и все остальные компоненты раствора сравнения бесцветны и, следовательно, не поглощают лучей в видимой области спектра, то в качестве раствора сравнения можно использовать дистиллированную воду.

Метод градуировочного графика.

Для определения содержания вещества методом градуировочного (калибровочного) графика готовят серию из 5–8 стандартных растворов разных концентраций (не менее 3 параллельных растворов для каждой точки).

При выборе интервала концентраций стандартных растворов руководствуются следующими положениями:

а) он должен охватывать область возможных изменений концентрации исследуемого раствора; желательно, чтобы оптическая плотность исследуемого раствора соответствовала примерно середине градуировочной кривой;

б) желательно, чтобы в этом интервале концентраций при выбранных тол-

щине кюветы l и аналитической длине волны λ, (в большинстве случаев $\lambda = \lambda_{макс}$ светопоглощающего соединения) соблюдался основной закон светопоглощения, т.е. график A = f(C) был линейным;

в) интервал рабочих значений λ, соответствующий интервалу стандартных растворов, должен обеспечивать максимальную воспроизводимость результатов измерений.

При совокупности перечисленных условий измеряют оптические плотности стандартных растворов относительно растворителя и строят график зависимости A = f(C). Полученная кривая называется градуировочной или калибровочной и имеет вид прямой выходящей из начала координат. Экстраполировать калибровочную прямую к значениям оптических плотностей, лежащим выше последней экспериментально полученной точки, не рекомендуется. Периодически (раз в неделю или реже) калибровочную кривую проверяют по 2–3 свежеприготовленным стандартным растворам. Калибровочные графики, построенные с реактивами разных партий, как правило, не совпадают. Поэтому при смене реактивов график необходимо построить заново. График, построенный при работе на одном приборе, нельзя использовать для расчетов результатов, полученных на другом.

Определив оптическую плотность опытного раствора A_x, находят ее значение на оси ординат, а затем на оси абсцисс – соответствующее ей значение концентрации C_x.

Этот метод применяют при выполнении серийных фотометрических анализов. Он дает хорошие результаты при соблюдении основного закона светопоглощения.

В отличие от других фотометрических методов, метод градуировочного графика позволяет определить концентрацию окрашенных растворов даже в тех случаях, когда основной закон светопоглощения не соблюдается. Для построения градуировочной кривой в этих случаях приготавливают значительно большее число стандартных растворов, отличающихся друг от друга по концентрации не более чем на 10%. Такой градуировочный график, имеющий на пологом участке угол наклона не менее 15°, все же позволяет проводить фотометрические измерения, несмотря на то, что между концентрацией раствора и его оптической плотностью нет линейной зависимости. Воспроизводимость определений в этом случае ниже, чем в случае линейной зависимости A = f(C).

Метод сравнения оптических плотностей стандартного и исследуемого растворов.

Для определения концентрации вещества берут аликвотную часть исследуемого раствора, приготавливают из нее окрашенный раствор для фотометрирования и измеряют его оптическую плотность. Затем аналогично приготавливают 2–3 стандартных окрашенных раствора определяемого вещества известной концентрации и измеряют их оптические плотности при той же толщине слоя (в тех же кюветах).

Значение оптической плотности исследуемого раствора равно:

$$A_x = \varepsilon_\lambda C_x l_x$$

Значение оптической плотности стандартного раствора равно:

$$A_{ст} = \varepsilon_\lambda C_{ст} l_{ст}$$

Разделив одно выражение на другое получим:

$$A_x/A_{ст} = \varepsilon_\lambda C_x l_x/(\varepsilon_\lambda C_{ст} l_{ст})$$

Так как $l_x = l_{ст}$, $\varepsilon_\lambda = const$, то

$$C_x = C_{ст} A_x/A_{ст}.$$

Метод сравнения применяют при однократных определениях; он требует обязательного соблюдения основного закона светопоглощения.

Существует и другой более точный способ определения неизвестной концентрации C_x, называемый методом ограничивающих растворов. Приготавливают два стандартных раствора с концентрациями C_1 и C_2 так, чтобы оптическая плотность первого из них A_1 была бы меньше оптической плотности A_x исследуемого раствора, а оптическая плотность A_2 второго стандартного раствора была бы, наоборот, больше, чем A_x.

Неизвестную концентрацию исследуемого вещества рассчитывают по формуле:

$$C_x = C_1 + (C_2 - C_1)(A_x - A_1)/(A_2 - A_1)$$

Вопросы для самоконтроля.

1. Какие методы анализа относятся к абсорбционно оптическим?
2. Чем обусловлено избирательное поглощение света молекулами?
3. Назовите единицы измерения длины волны.
4. Какие методы и на основании чего выделяют в фотометрическом анализе?
5. Дайте определение следующих понятий: пропускание, коэффициент пропускания, оптическая плотность, молярный коэффициент светопоглощения.
6. Дайте формулировку следующих законов: закон Бера, закон Бугера–Ламберта и закон Бугера-Ламберта-Бера. Какой из этих законов лежит в основе фотометрических методов анализа?
7. Чему равна оптическая плотность раствора при соблюдении основного закона светопоглощения?
8. Что такое спектр поглощения вещества?
9. Дайте определение следующих понятий: хромофор, батохромный, гипсохромный, гиперхромный, гипохромный эффекты.
10. Назовите хромофоры характерные для белков и нуклеиновых кислот. Какие из них вносят наибольший вклад в спектр поглощения?
11. На чем основано определение концентрации растворов с помощью фотометрических методов анализа?
12. Какие фотометрические методы определения концентрации растворов вы знаете?
13. Выделите основные этапы определения концентрации исследуемого раствора с помощью метода градуировочного графика.
14. Каким образом осуществляется выбор интервала концентраций стандартных растворов при построении калибровочной кривой?
15. В каких случаях использование калибровочной кривой для определения концентрации исследуемого раствора недопустимо?
16. Какие преимущества имеет метод градуировочного графика по сравнению с другими фотометрическими методами анализа?
17. На чем основано определение концентрации с помощью метода сравнения оптических плотностей стандартного и исследуемого растворов? Назовите пре-

имущества и недостатки этого метода.

18. Что вы знаете о методе ограничивающих растворов?

Задачи.

1. Используя данные, приведенные в таблице, расчитайте концентрации ферментов.

Фермент	Оптическая плотность		Длина оптического пути, см	ε_λ, $M^{-1}см^{-1}$	Концентрация, моль/л
Оксигемоглобин	0,4 (405 нм)	0,5 (412 нм)	1	ε_{412} = 135000	
Дезоксигемоглобин	0,3 (425 нм)	0,4 (430 нм)	0,5	ε_{430} = 119000	
Карбоксигемоглобин	0,4 (410 нм)	0,5 (419 нм)	1	ε_{419} = 191000	
Каталаза	0,2 (415 нм)	0,3 (405 нм)	0,1	ε_{405} = 324000	
Пероксидаза хрена	0,6 (410 нм)	0,7 (403 нм)	0,5	ε_{403} = 109000	

Примечание. В графе "оптическая плотность" в скобках указана длина волны, при которой измерялась оптическая плотность.

2. Расчитайте концентрации ферментов с помощью метода сравнения оптических плотностей стандартного и исследуемого растворов. В качестве стандартных используйте растворы ферментов из предыдущей задачи.

Фермент	Оптическая плотность		Концентрация стандартного раствора, моль/л	Концентрация исследуемого раствора, моль/л
	Исследуемый раствор	Стандартный раствор		
Оксигемоглобин	0,7 (415 нм)			
Дезоксигемоглобин	0,3 (430 нм)			
Карбоксигемоглобин	0,6 (419 нм)			
Каталаза	0,5 (405 нм)			
Пероксидаза хрена	0,9 (403 нм)			

3. Рассчитайте количество фермента необходимое для приготовления 3 мл раствора с оптической плотностью 0,8.

Фермент	Молекулярный вес	Длина оптического пути, см	ε_λ, $M^{-1}см^{-1}$	Концентрация, моль/л	Количество, мг
Оксигемоглобин	68128	0,1	ε_{412} = 135000		
Дезоксигемоглобин	68000	0,5	ε_{430} = 119000		
Карбоксигемоглобин	68112	1	ε_{419} = 191000		
Каталаза	240000	0,2	ε_{405} = 324000		
Пероксидаза хрена	40000	1	ε_{403} = 109000		

4. На основании данных, приведенных в таблице, рассчитайте оптическую плотность раствора фермента.

Фермент	Молекулярный вес	Длина оптического пути, см	ε_λ, $М^{-1}см^{-1}$	Концентрация, мг/мл	Оптическая плот-
Оксигемоглобин	68128	0,5	ε_{412} = 135000	1	
Дезоксигемоглобин	68000	0,1	ε_{430} = 119000	5	
Карбоксигемоглобин	68112	0,5	ε_{419} = 191000	3	
Каталаза	240000	1	ε_{405} = 324000	2	
Пероксидаза хрена	40000	0,2	ε_{403} = 109000	3	

5. 0,1 мл раствора аденозина разбавили до объема 25 мл. Оптическая плотность разбавленного раствора при 259 нм оказалась равна 0,77. Известно, что коэффициент молярной экстинкции аденозина при 259 нм составляет 15400 $М^{-1}см^{-1}$. Какова концентрация исходного раствора аденозина? Каково, пропускание разбавленного раствора при 259 нм?

Темы рефератов

1. ИК-спектроскопия.
2. Спектрофлуориметрия.
3. Турбидиметрия и нефелометрия.
4. ЭПР-спектроскопия.
5. ЯМР-спектроскопия.

Литература

1. Алесковский В.Б., Бардин В.В., Бойчинова Е.С. и др. Физико-химические методы анализа. Л.: Химия, 1988.
2. Уильямс Б., Уилсон К. Методы практической биохимии. М.: Мир, 1978.
3. Мецлер Д. Биохимия. М.: Мир, 1980.
4. Рубин А.Б. Биофизика. М.: Высшая школа, 1987.
5. Практикум по биохимии. Под редакцией С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой. М.: Московский университет, 1989.

ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ФОТОМЕТРИЧЕСКИХ ИЗМЕРЕНИЙ.

Для фотометрических измерений используют две большие группы приборов: фотоколориметры и спектрофотометры. В колориметрах нужные спектральные диапазоны выделяются при помощи светофильтров, ограничивающих участки спектра, в которых могут проводится измерения. В спектрофотометрах участки спектра выделяются при помощи призм или дифракционных решеток, что позволяет устанавливать любую длину волны в заданном диапазоне.

Конкретная последовательность операций при измерении оптической плотности или пропускания зависит от конструкции спектрофотометра или колориметра. Однако основные принципы остаются неизменными. Сначала устанавливают необходимую длину волны, выбирая светофильтр на колориметре или вращая соответствующую рукоятку на спектрофотометре. Затем устанавливают нуль. Для этого в световой поток помещают кювету со стандартным раствором. Изменяя ширину ще-

ли, добиваются того, чтобы показания прибора соответствовали величине, предусмотренной инструкцией. На следующем этапе стандартный раствор заменяют исследуемым и производят отсчет величины оптической плотности или пропускания.

СПЕКТРОФОТОМЕТРЫ.

Современные спектрофотометры позволяют работать с высокомонохроматизированным потоком излучения. Они применяются для концентрационного анализа и при изучении спектров поглощения веществ.

Устройство и принцип действия спектрофотометра. Структурную схему спектрофотометра можно представить в виде следующих основных блоков: источник света, монохроматор, кюветное отделение, фотоэлемент, регистрирующее устройство.

Световой пучок от источника света попадает в монохроматор через входную щель и разлагается дифракционной решеткой или призмой в спектр. В монохроматический поток излучения, поступающий из выходной щели в кюветное отделение, поочередно вводятся контрольный и исследуемый образцы. Излучение, прошедшее через кювету, попадает на фотоэлемент, который преобразовывает световую энергию в электрическую. Электрический сигнал затем усиливается и регистрируется.

Монохроматоры. Монохроматор – это оптическая система, выделяющая из всего спектра источника света излучение определенной длины волны. Это обычно призмы, по-разному преломляющие свет разных длин волн, или дифракционные решетки. В видимой области используются обычные стеклянные призмы, но в ультрафиолетовой области они не годятся, поскольку стекло начинает поглощать уже при $\lambda < 400$ нм, поэтому призмы делают из кварца.

В качестве монохроматоров применяются также дифракционные решетки, которые представляют собой плоскопараллельную пластину с нанесенными на ней параллельными линиями – бороздками. Белый свет из-за дифракции на параллельных бороздках разлагается на непрерывный спектр. Обычно в монохроматорах сначала выделяют пучок света с определенным диапазоном длин волн с помощью призмы, а затем разлагают его еще раз решеткой. Так получают строго монохроматический свет. Основное достоинство дифракционных решеток состоит в том, что можно увеличивать их разрешающую способность, поскольку она прямо пропорциональна плотности линий. Кроме того, во всем диапазоне длин волн дифракционные решетки имеют линейное разрешение, тогда как разрешение призменного монохроматора с увеличением длины волны уменьшается.

Кюветы. Исследуемое вещество растворяют в соответствующем растворе и помещают в оптически прозрачный сосуд для измерений – *кювету.* Обычно кюветодержатель имеет ячейки для четырех кювет. Поскольку стекло поглощает ультрафиолетовый свет, для проведения измерений в ультрафиолетовой области спектра используют кварцевые кюветы. Для измерений в видимой области можно использовать пластиковые или стеклянные кюветы. При работе с летучими или химически активными веществами кюветы закрывают крышками.

Поскольку кювета, помещенная в спектрофотометр, становится составной частью его оптической системы, с ней нужно обращаться очень аккуратно. Царапины и грязь на стенках кюветы сильно рассеивают и поглощают свет, искажая результаты измерений. Об этом особенно надо помнить при работе в ультрафиолетовой об-

ласти. Кюветы можно протирать мягкими тканями, например, из хлопка. Не рекомендуется использовать для этих целей фильтровальную бумагу. Поскольку органические молекулы поглощают в ультрафиолетовой области, ни в коем случае нельзя касаться оптических (прозрачных) стенок кюветы. Раствор лучше заливать в кювету, поставив ее в предварительно вынутый из прибора кюветодержатель. Кюветы довольно хрупки, особенно кварцевые, поэтому работать с ними надо осторожно, не допуская механических повреждений.

Содержимое кюветы должно быть гомогенным – это необходимое условие получения воспроизводимых данных. Нужно следить за тем, чтобы раствор не был мутным. Особенно мешают измерениям пузырьки воздуха, сильно увеличивающие рассеяние. Нельзя наливать в кювету очень холодный раствор, поскольку при этом на наружных стенках кюветы конденсируются пары воды воздуха, и стенки становятся непрозрачными.

Если кюветы загрязнены посторонними примесями, их следует промыть дистиллированной водой и (или) растворителем, в котором растворено исследуемое вещество. Кюветы можно мыть мягкими детергентами. Не рекомендуется мыть кюветы концентрированными кислотами или щелочами, а также другими травящими агентами.

Кюветы нужно заполнять до такого уровня, чтобы поток излучения проходил целиком через слой раствора. Чаще всего используются кюветы с оптическим путем 1 см, в которые обычно заливают 2,5–3 мл раствора. В такие кюветы входит 4–5 мл, но заполняют их полностью лишь в том случае, когда это необходимо. Есть кюветы с оптическим путем 50, 20, 5, 2 и 1 мм.

Фотоэлементы. Фотоэлементы преобразовывают световую энергию в электрическую. Электрический сигнал затем усиливается и регистрируется.

Фотоны, бомбардируя поверхность фотоэлемента, выбивают из него электроны, количество которых пропорционально интенсивности света. Эти электроны летят к положительному электроду. В результате в замкнутой цепи возникает электрический ток, который регистрируется по падению напряжения на сопротивлении, находящемся в этой цепи. Напряжение можно усилить, и после компенсации такого сигнала потенциометром, отградуированном в единицах поглощения, на датчике регистрируется непосредственно поглощение образца.

Фотоумножители обычно более чувствительны, чем простые фотоэлементы. Это происходит из-за того, что электроны, вылетевшие из фоточувствительного слоя, ускоряются высоким напряжением, а из-за соударений в газе возникают вторичные электроны, что и приводит к возрастанию тока.

Ширина щели. От размера щели зависит диапазон длин волн света, падающего на образец. Поэтому для получения надежных результатов надо работать при минимально узкой для данных условий эксперимента щели. Если щель выбрана правильно, то при изменении ее размеров вдвое показания прибора не меняются.

Обычно нулевое значение поглощения устанавливают щелью, но в хороших спектрофотометрах это делают, изменяя напряжение фотоэлемента. Такая регулировка позволяет работать при постоянной ширине щели.

Спектрофометр СФ-46

Назначение и технические данные. Однолучевой спектрофотометр СФ-46

со встроенной микропроцессорной системой предназначен для измерения пропускания, оптической плотности жидких и твердых веществ в области 190–1100 нм. Диспергирующим элементом служит дифракционная решетка с переменным шагом и криволинейным штрихом. Пределы измерения коэффициентов пропускания 1–100% (оптической плотности 0–2,0). Пределы допускаемой абсолютной погрешности при измерении коэффициентов пропускания в спектральном диапазоне 400–750нм не более 0,5%, в остальном спектральном диапазоне не более 1%.

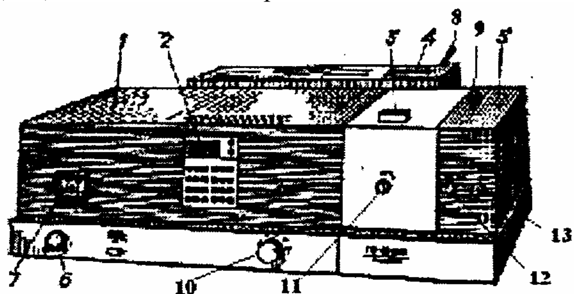


Рис. Внешний вид спектрофотометра СФ-46.
1 - монохроматор; 2 - микропроцессорная система; 3 - кюветное отделение; 4 - осветитель; 5 - камера с фотоприемниками и усилителями; 6 - рукоятка изменения длины волны; 7 - шкала длин волн; 8 - переключатель ламп; 9 - рукоятка переключения фотоэлементов; 10 - рукоятка изменения ширины щели; 11 - рукоятка перемещения каретки; 12 - рукоятка переключения шторки; 13 - рукоятка установки темнового тока фотоэлемента.

Порядок работы.

1. В соответствии с выбранным спектральным диапазоном измерений установите в рабочие положения фотоэлемент и источник излучения.

При работе в области спектра 186–340 нм установите переключатель ламп на кожухе осветителя в положение «Д» (после минутного прогрева дейтериевая лампа загорается), при работе в области спектра 340–1100 нм – в положение «Н» (лампа накаливания загорается сразу).

Переключение фотоэлемента производится с помощью рукоятки 9. Если рукоятка находится в положении «Ф», в схему включен сурьмяно-цезиевый фотоэлемент для измерений в области спектра от 186 до 620 нм. Если рукоятка установлена в положение «К», в схему включен кислородно-цезиевый фотоэлемент – для измерений в области спектра от 620 до 1100 нм.

2. Закройте фотоэлемент, поставив рукоятку 12 в положение «ЗАКР».
3. Рукояткой 10 установите ширину щели 0,15 нм. Перед каждым новым измерением во избежание засвечивания фотоэлементов устанавливайте ширину щели 0,15 нм.
4. Установите требуемую длину волны, вращая рукоятку 6 в сторону увеличения длин волн. Если при этом шкала повернется на большую величину, то возвратите ее назад на 5–10 нм и снова подведите к требуемому делению.
5. Нажмите кнопку «СЕТЬ», после чего должна загореться сигнальная лампа и нажмите клавишу «ПУСК», после чего должна высветиться запятая на табло. Стабильная работа спектрофотометра обеспечивается через 30 минут после его вклю-

чения.

6. Установите в кюветное отделение от 1 до 4 исследуемых образцов. При снятии показаний крышка кюветного отделения должна быть закрыта.

7. Нажмите клавишу «Ш(0)», при этом на цифровом табло высветится числовое значение темнового тока фотоэлемента. Рукояткой «НУЛЬ» установите его в диапазоне от 0,05 до 0,1. Показания с табло снимайте, нажимая клавишу «Ш(0)» до появления значения, отличающегося от предыдущего не более чем на 0,001.

8. Установите на пути потока излучения контрольный образец, перемещая рукояткой 11 каретку. При отсутствии контрольного образца измерение будет проводиться относительно воздуха.

9. Установите рукоятку переключения шторки в положение «ОТКР».

10. Нажмите клавишу «К(I)» и снимите показания с фотометрического табло. Слева от табло высвечивается индекс "I". Оно должно быть в пределах 0,5–5,0. При показании меньше 0,5 следует увеличить ширину щели (рукоятка 10). Клавишу «К(I)» нажимайте несколько раз до появления значения, отличающегося от предыдущего не более чем на 0,01.

11. Нажмите клавишу «D(5)», при этом на табло должно высветится показание 0,000–0,001, а слева – «5».

12. Закройте шторку (рукоятка 12 в положении «ЗАКР»). Поставьте в кюветное отделение исследуемый образец, откройте шторку. Нажмите кнопку «D(5)» и снимите показания с табло.

13. Нажав кнопку «СЕТЬ» выключите спектрофотометр.

14. Протрите кюветное отделение и сделайте запись в журнале "Учет наработки спектрофотометра СФ-46".

Спектрофометр СФ-26

Назначение и технические данные. Спектрофотометр СФ-26 предназначен для измерения пропускания и оптической плотности жидких и твердых веществ в области 186–1100 нм. Пределы измерения коэффициента пропускания 3–100% (оптической плотности 0–2,0). Основная абсолютная погрешность измерения по шкале коэффициентов пропускания в области спектра 190–1100 нм не более 1%.

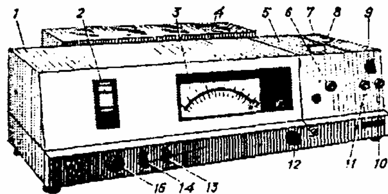


Рис. Внешний вид спектрофотометра СФ-26.
1 - монохроматор; 2 - шкала длин волн; 3 - измерительный прибор; 4 - осветитель с источником излучения и стабилизатором; 5 - кюветное отделение; 6 - рукоятка перемещения каретки с кюветами; 7 - камера с фотоприемниками и усилителем; 8 - рукоятка переключения фотоэлементов; 9 - рукоятка установки чувствительности; 10 - рукоятка установки на «0»; 11 - рукоятка шторки; 12 - рукоятка регулировки ширины щели; 13 - рукоятка «Отсчет»; 14 - рукоятка компенсации; 15 - рукоятка

шкалы длин волн.

Порядок работы.

1. В соответствии с выбранным спектральным диапазоном измерений установите в рабочие положения фотоэлемент и источник излучения.

При работе в области спектра 186–340 нм установите переключатель ламп на кожухе осветителя в положение «Д» (после минутного прогрева дейтериевая лампа загорается, одновременно загорается и соответствующая индикаторная лампочка на передней панели), при работе в области спектра 340–1100 нм – в положение «Н» (лампа накаливания и индикаторная лампочка загораются сразу).

Переключение фотоэлемента производится с помощью рукоятки 8. Если рукоятка находится в положении «Ф», в схему включен сурьмяно-цезиевый фотоэлемент для измерений в области спектра от 186 до 620 нм. Если рукоятка установлена в положение «К», в схему включен кислородно-цезиевый фотоэлемент – для измерений в области спектра от 620 до 1100 нм.

2. Установите рукоятку «КОМПЕНСАЦИЯ» в положение «0».
3. Установите рукоятку «ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ» в положение «1».
4. Установите рукоятку 13 в положение «×1».
5. Закройте фотоэлемент, поставив рукоятку 11 шторки в положение ЗАКР.
6. Установите требуемую длину волны, вращая рукоятку 15 в сторону увеличения длин волн. Если при этом шкала повернется на большую величину, то возвратите ее назад на 5–10 нм и снова подведите к требуемому делению.
7. Включите тумблер «СЕТЬ», после чего должны загореться сигнальная лампа «СЕТЬ» и сигнальная лампа «Д» или «Н» в соответствии с выбранным источником излучения. Стабильная работа спектрофотометра обеспечивается через 30 минут после его включения.
8. Установите рукояткой 10 «НУЛЬ» стрелку измерительного прибора на деление «2,0» шкалы оптической плотности «D».
9. Установите на пути потока излучения контрольный образец, перемещая рукояткой 6 каретку. При отсутствии контрольного образца измерение будет проводиться относительно воздуха.
10. Откройте фотоэлемент, установив рукоятку 11 шторки в положение «ОТКР».
11. Установите стрелку измерительного прибора на деление «0» шкалы «D», вращая рукоятку 12 механизма изменения ширины щели.
12. Установите на пути потока излучения опытный образец, перемещая рукояткой 6 каретку. Снимите показания прибора по шкале оптической плотности «D».
13. Выключите спектрофотометр тумблером «СЕТЬ».
14. Протрите кюветное отделение и сделайте запись в журнале "Учет наработки спектрофотометра СФ-26".

ФОТОЭЛЕКТРОКОЛОРИМЕТРЫ.

Фотоэлектроколориметр – это оптический прибор, в котором монохроматизация потока излучения осуществляется с помощью светофильтров.

Колориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2

Назначение и технические данные. Однолучевой фотоколориметр КФК-2

предназначен для измерения пропускания, оптической плотности и концентрации окрашенных растворов, рассеивающих взвесей, эмульсий и коллоидных растворов в области спектра 315–980 нм. Весь спектральный диапазон разбит на спектральные интервалы, выделяемые с помощью светофильтров. Пределы измерения пропускания от 100 до 5% (оптической плотности от 0 до 1,3). Основная абсолютная погрешность измерения пропускания не более 1%.

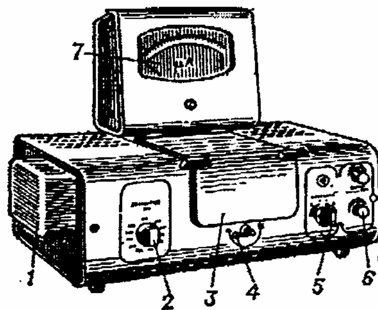


Рис. Общий вид КФК-2.
1 - осветитель; 2 - рукоятка ввода цветных светофильтров; 3 - кюветное отделение; 4 - рукоятка перемещения кювет; 5 - рукоятка (ввода фотоприемников в световой поток) «Чувствительность»; 6 - рукоятка настройки прибора на 100%-е пропускание; 7 - микроамперметр.

Светофильтры. Для того чтобы из всей видимой области спектра выделить лучи определенных длин волн в фотоколориметрах на пути световых потоков перед поглощающими растворами устанавливают избирательные поглотители света – светофильтры. Светофильтры пропускают лучи лишь в определенном интервале длин волн с полушириной пропускания $\lambda_{1/2макс}$–$\lambda'_{1/2макс}$ и практически полностью поглощают лучи других длин волн (см. таблицу). Чем уже область максимального пропускания лучей (размытость максимума пропускания) светофильтра, тем выше его избирательность к лучам этого интервала длин волн.

Характеристики светофильтров

Маркировка на диске	Маркировка светофильтра	Длина волны, соответствующая максимуму пропускания, нм	Полуширина полосы пропускания, нм
1	315	315±5	35±15
2	364	364±5	25±10
3	400	400±5	45±10
4	440	440±10	40±15
5	490	490±10	35±10
6	540	540±10	25±10
7	590	590±10	25±10
8	670	670±5	20
9	750	750±5	20
10	870	870±5	25
11	980	980±5	25

Порядок работы

1. Включите колориметр в сеть за 15 минут до начала измерений. Во время прогрева кюветное отделение должно быть открыто (при этом шторка перед фотоприемником перекрывает световой пучок).
2. Введите рабочий светофильтр.
3. Установите минимальную чувствительность колориметра. Для этого ручку "ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ" установите в положение «1», ручку "УСТАНОВКА 100 ГРУБО" – в крайнее левое положение.
4. Стрелку колориметра вывести на нуль с помощью потенциометра «НУЛЬ».
5. В световой пучок поместите кювету с контрольным раствором.
6. Закройте крышку кюветного отделения
7. Ручками "ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ" и "УСТАНОВКА 100 ГРУБО" и "ТОЧНО" установите стрелку микроамперметра на деление «100» шкалы пропускания.
8. Поворотом рукоятки кюветной камеры поместите в световой поток кювету с исследуемым раствором.
9. Снимите показания по шкале колориметра в соответствующих единицах (Т% или Д).
10. После окончания работы отключите колориметр от сети, очистите и протрите насухо кюветную камеру.

Определение концентрации вещества в растворе с помощью КФК-2.

При определении концентрации вещества в растворе с помощью калибровочного графика следует соблюдать следующую последовательность:

- выбрать светофильтр;
- выбрать кювету;
- построить градуировочную кривую;
- измерить оптическую плотность исследуемого раствора и определить его концентрацию, используя градуировочную кривую.

Выбор светофильтра. Наличие в колориметре узла светофильтров и набора кювет позволяет подобрать такое их сочетание, при котором погрешность в определении концентрации будет минимальной.

Если спектральные характеристики окрашенного вещества неизвестны, светофильтр для работы можно выбрать самостоятельно. В видимой части спектра воспринимаемый цвет есть результат избирательного поглощения определенного участка спектра белого света. Цвет раствора является дополнительным к цвету поглощения излучения. Поэтому измерение поглощения следует проводить в дополнительной для цветной реакции области спектра. Так, если раствор окрашен в сине-зеленый цвет, то нужно измерять поглощение этим раствором красного цвета.

Интервал длин волн поглощенного излучения, нм	Цвет поглощенного излучения	Наблюдаемый цвет
400-450	фиолетовый	желто-зеленый
450-480	синий	желтый
400-550	сине-зеленый	оранжевый
500-560	зеленый	красно-пурпурный
400-610	сине-зелено-желтый	красный
450-650	зелено-желто-красный	пурпурный
625-750	Красный	сине-зеленый

Более точный выбор светофильтра осуществляется следующим образом.

Налейте окрашенный раствор в кювету и определите оптическую плотность для всех светофильтров.

По полученным данным постройте кривую, откладывая по горизонтальной оси длины волн, соответствующие максимуму коэффициента пропускания светофильтров (см. таблицу), а по вертикальной оси – соответствующие значения оптической плотности раствора. Отметьте тот участок кривой, для которого выполняются следующие условия:

- оптическая плотность имеет максимальную величину;
- ход кривой примерно параллелен горизонтальной оси, т.е. оптическая плотность мало зависит от длины волн.

Светофильтр для работы выбирается так, чтобы длина волны, соответствующая максимуму коэффициента пропускания светофильтра, приходилась на отмеченный выше участок спектральной кривой испытуемого раствора.

Если эти условия выполняются для нескольких светофильтров, то выберите тот из них, для которого чувствительность колориметра выше.

Выбор кюветы. Предварительный выбор кювет проводится визуально, исходя из интенсивности окраски раствора. Если раствор интенсивно окрашен (темный), следует пользоваться кюветами с малой длиной оптического пути (1–5 мм). В случае слабоокрашенных растворов измерения проводят в кюветах с большой длиной оптического пути (20–50 мм).

Построение градуировочной кривой и определение концентрации. Принципы построения градуировочного графика и его использование для определения концентрации вещества подробно рассмотрены в разделе "*Метод градуировочного графика*".

Вопросы для самоконтроля

1. В чем заключается принципиальное отличие спектрофотометров от фотоколориметров?
2. Расскажите об устройстве и принципе действия спектрофотометра.
3. Каким образом получают в спектрофотометре монохроматический световой поток?
4. Для чего нужны светофильтры?
5. Как правильно выбрать рабочий светофильтр?
6. Кюветы из какого материала можно использовать при работе как в ультрафиолетовой, так и в видимой области спектра? Почему?

7. Перечислите основные правила работы с кюветами.
8. Благодаря какому устройству в спектрофотометре световая энергия преобразовывается в электрическую?
9. Что свидетельствует о правильном выборе ширины щели?
10. Расскажите о последовательности операций при измерении оптической плотности на спектрофотометре СФ-46 в (1) видимой и (2) ультрафиолетовой областях спектра.
11. Расскажите о последовательности операций при измерении оптической плотности на спектрофотометре СФ-26 в (1) видимой и (2) ультрафиолетовой областях спектра.
12. Расскажите о правилах работы на КФК-2.
13. Как осуществляется выбор рабочего светофильтра и кюветы?
14. Как выглядит общая схема определения концентрации раствора с помощью КФК-2?

Литература

1. Спектрофотометр СФ-26. Техническое описание и инструкция по эксплуатации.
2. Спектрофотометр СФ-46. Техническое описание и инструкция по эксплуатации.
3. Колориметр фотоэлектрический концентрационный КФК-2. Техническое описание и инструкция по эксплуатации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

Изучение оптических свойств различных форм гемоглобина.

Оптические свойства гемоглобина. Гемоглобин – это глобулярный белок способный связывать и переносить молекулярный кислород. Гемоглобин является основным компонентом эритроцитов. В одном эритроците содержится около 280 миллионов молекул гемоглобина, каждая из которых состоит примерно из 10 тысяч атомов водорода, углерода, азота, кислорода, серы и железа.

Основная функция гемоглобина – обратимое связывание молекулярного кислорода и доставка его во все клетки организма. Молекулярный вес гемоглобина равен 68000.

Гемоглобин – представитель гемопротеинов, т.е. группы сложных белков. Молекула его состоит из четырех субъединиц – двух α и двух β субъединиц. Полипептидная цепь каждой из субъединиц специфическим образом уложена вокруг большого плоского железосодержащего гема. Все четыре цепи гемоглобина сходны между собой по форме. Форма и функция гемоглобинов различных животных сходны, однако аминокислотный состав их различается и тем сильнее, чем более эволюционно они удалены друг от друга.

Гем только в связи с нативным глобином способен лабильно связывать кислород. При поглощении кислорода β-цепи гемоглобина сближаются, при отдаче его – расходятся. Положение α-цепей при этом не меняется. Следовательно, присоединение и отдача кислорода молекулой гемоглобина сопровождается изменением его структуры, что приводит к изменению спектра поглощения гемоглобина. Присоединив молекулу кислорода, гемоглобин переходит в оксигенированную форму.

К распространенным производным гемоглобина относятся также метгемог-

лобин и карбоксигемоглобин. В метгемоглобине железо находится в трехвалентном состоянии, в то время как в деоксигенированном и в оксигенированном гемоглобине – в двухвалентном. Метгемоглобин образуется при выдерживании на воздухе растворов оксигемоглобина. Гемоглобин обладает большим сродством к угарному газу (CO), переходя при взаимодействии с ним в карбоксигемоглобин, не обладающий способностью обратимо присоединять кислород. В основе отравления людей угарным газом лежит образование в их крови значительных количеств карбоксигемоглобина, что приводит к гипоксии организма.

Каждая форма гемоглобина характеризуется определенным спектром поглощения, представляющим собой зависимость оптической плотности раствора гемоглобина от длины волны света.

Наиболее интенсивной полосой в спектре поглощения гемоглобина является полоса Соре, принадлежащая порфириновой части его молекулы. По изменению положения и интенсивности поглощения этой полосы можно судить о структурных изменениях молекул различных форм гемоглобина (см. таблицу).

Спектральные характеристики различных форм гемоглобин

	α-полоса		β-полоса		Полоса Соре	
	λ, нм	ε_λ, $М^{-1}см^{-1}$	λ, нм	ε_λ, $М^{-1}см^{-1}$	λ, нм	ε_λ, $М^{-1}см^{-1}$
Оксигемоглобин	577	14600	542	13800	412	135000
Дезоксигемоглобин	555	13500			430	119000
Карбоксигемоглобин	569	13400	539	13400	419	191000

При хранении растворов гемоглобина прозрачность их уменьшается, что приводит при спектрофотометрировании к увеличению оптической плотности за счет роста светорассеяния в его растворах.

Светорассеяние является функцией величины и числа частиц, находящихся в растворе, и также позволяет судить о процессах изменения структуры веществ, и в частности белков, под воздействием определенных факторов.

***Оборудование и материалы*:** СФ-26(46), КФК-2, центрифуга на 9000 об/мин, центрифужные пробирки, кюветы, пенициллиновые флаконы, пипетки Пастера, прибор для получения оксида углерода, гемоглобин кристаллический, хлористый натрий, гепарин, бихромат калия, феррицианид калия, дитионит натрия.

Получение раствора оксигемоглобина. Растворы гемоглобина даже при хранении в холодильнике в течение трех-четырех дней теряют свою прозрачность и становятся непригодными для спектрофотометрических измерений. В связи с этим для работы рекомендуется использовать свежеприготовленные растворы. Ниже приводится описание методики выделения оксигемоглобина белых крыс.

- Кровь берут у декапитированных животных. В основе метода получения гемоглобина лежит явление гемолиза эритроцитов под влиянием ряда соединений (толуол, вода, и др.).
- Цельную кровь стабилизируют гепарином, растворенным в 0,85%-ном растворе хлористого натрия.
- Для отделения плазмы стабилизированную кровь центрифугируют в течение 20 минут при 6000 об/мин.

- Плазму крови отбирают при помощи Пастеровской пипетки.
- К эритроцитам добавляют трехкратный объем 0,85%-ного раствора хлористого натрия, осторожно при этом, размешивая суспензию стеклянной палочкой.
- Суспензию центрифугируют в течение 5 минут при 6000 об/мин.
- Промывают эритроциты 3–4 раза. Промытые эритроциты подвергают гемолизу дистиллированной водой в течение 20 минут при 9000 об/мин для удаления стромы.
- С помощью приведенных ниже методов определяют концентрацию гемоглобина и сравнивают полученные результаты с данными литературы, согласно которым содержание гемоглобина в крови крыс составляет 117–166 г на 1л крови.

Определение концентрации гемоглобина.

1. Определение концентрации оксигемоглобина с помощью градуировочного графика (работа выполняется на КФК-2).

- Приготовить ряд стандартных растворов кристаллического препарата оксигемоглобина с известными концентрациями. Обосновать выбор интервала концентраций.
- Выбрать нужный светофильтр (см. раздел *"Определение концентрации вещества в растворе с помощью КФК-2"*). Обосновать сделанный выбор.
- Измерить оптические плотности стандартных растворов при выбранном светофильтре.
- Построить градуировочную кривую, откладывая по оси абсцисс значения концентраций, а по оси ординат – соответствующие им величины оптической плотности.
- Раствор с неизвестной концентрацией налить в ту же кювету, для которой построена градуировочная кривая, и, включив тот же светофильтр, определить оптическую плотность раствора. По градуировочной кривой находят концентрацию вещества, соответствующую измеренному значению оптической плотности.
- Для справок использовать раздел *"Метод градуировочного графика"*.

2. Определение концентрации оксигемоглобина с помощью метода ограничивающих растворов и метода сравнения оптических плотностей стандартного и исследуемого растворов (работа выполняется на КФК-2).

- приготовить растворы оксигемоглобина известной концентрации.
- измерить оптические плотности стандартного и исследуемого растворов гемоглобина при соответствующем светофильтре (см. предыдущий раздел).
- произвести необходимые расчеты.

Для справок использовать раздел *"Метод сравнения оптических плотностей стандартного и исследуемого растворов"*.

3. Определение концентрации оксигемоглобина с помощью коэффициента молярной экстинкции (работа выполняется на СФ-26(46)).

3.1. Определение коэффициента молярной экстинкции оксигемоглобина.

- Приготовить стандартный раствор оксигемоглобина известной концентрации.
- Снять спектр поглощения стандартного раствора в интервале длин волн 400–420 нм (оптическая плотность раствора измеряется через 1нм).

- Представить в графическом виде зависимость оптической плотности раствора от длины поглощаемого света, откладывая по оси ординат оптическую плотность раствора, а по оси абсцисс соответствующие длины волн.
- Найти длину волны ($\lambda_{макс}$), на которую приходится максимум поглощения.
- Зная оптическую плотность при $\lambda_{макс}$, концентрацию (моль/л) и длину оптического пути l, рассчитать значение коэффициента молярной экстинции.

3.2. Определение концентрации оксигемоглобина.

- измерить оптическую плотность исследуемого раствора гемоглобина на нужной длине волны. При необходимости раствор гемоглобина разбавить дистиллированной водой или использовать кювету с меньшей длиной оптического пути.
- произвести необходимые расчеты с учетом коэффициента молярной экстингции, разведения и длины оптического пути.

Для справок использовать раздел *"Основные закономерности светопоглощения"*.

4. Анализ полученных результатов.

- Оформить полученные результаты в виде таблицы:

Метод определения концентрации гемоглобина	Концентрация гемоглобина	
	моль/л	мг/мл
1		
2		
3		
4		

- Сравнить полученные результаты с данными литературы. Какой метод, на ваш взгляд, позволяет наиболее корректно оценивать концентрацию гемоглобина? Ответ обосновать.

Влияние различных химических веществ на светопоглощение и светорассеяние раствора гемоглобина.

1. Образование метгемоглобина при выдерживании на воздухе растворов оксигемоглобина (работа выполняется на СФ-26(46)).

Раствор оксигемоглобина разбавить дистиллированной водой до оптической плотности раствора, попадающей в диапазон 0,4–0,5.

Снять спектр поглощения раствора оксигемоглобина в интервале длин волн 380–600нм (оптическая плотность раствора измеряется через каждые 5 нм).

Представить в графическом виде зависимость оптической плотности раствора от длины поглощаемого света, откладывая по оси ординат оптическую плотность раствора, а по оси абсцисс соответствующие длины волн. Найти максимумы поглощения оксигемоглобина.

Выдержать раствор при свободном доступе воздуха в течение следующих временных интервалов: 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 минут. По завершении каждого из интервалов измерить оптическую плотность раствора при длине волны, соответствующей максимуму поглощения оксигемоглобина. Построить кинетиче-

скую кривую изменения поглощения раствора оксигемоглобина (зависимость оптической плотности раствора от времени выдерживания оксигемоглобина на воздухе).

Снять спектр поглощения раствора оксигемоглобина, выдерживавшегося на воздухе в течение 180 мин.

2. Образование метгемоглобина при обработке оксигемоглобина феррицианидом калия (работа выполняется на СФ-26(46)).

Добавить к раствору оксигемоглобина 1–2 капли насыщенного раствора феррицианида калия. Визуально оценить изменение окраски. Раствор метгемоглобина имеет коричневую окраску.

Снять спектр поглощения раствора гемоглобина в интервале длин волн 380–600 нм. Для компенсации светопоглощения за счет феррицианида в контроль добавляется такой же объем раствора этого вещества, какой был добавлен к раствору оксигемоглобина.

3. Получение восстановленного (деоксигенированного) гемоглобина (работа выполняется на СФ-26(46).

Добавить к водному раствору оксигемоглобина несколько кристаллов дитионита натрия. Визуально оценить изменение окраски. Ярко-алая окраска (цвет оксигемоглобина) переходит в синевато-красную, характерную для гемоглобина.

Снять спектр поглощения раствора в интервале длин волн 380–600нм.

Определить концентрацию восстановленного гемоглобина с помощью коэффициента молярной экстинкции (см. таблицу в разделе *"Оптические свойства гемоглобина".*)

4. Получение карбоксигемоглобина (работа выполняется на СФ-26(46).

Добавить к водному раствору оксигемоглобина несколько кристаллов дитионита натрия.

Пропустить через раствор оксид углерода, полученный при смешивании концентрированных муравьиной и серной кислот.

Снять спектр поглощения раствора в интервале длин волн 380–600 нм.

Определить концентрацию карбоксигемоглобина с помощью коэффициента молярной экстинкции (см. таблицу в разделе *"Оптические свойства гемоглобина".*)

5. Анализ полученных результатов.

Результаты оформить в виде таблицы.

Производные гемоглобина	$\lambda_{макс}$, нм	оптическая плотность	$\lambda_{макс}$, нм	оптическая плотность	$\lambda_{макс}$, нм	оптическая плотность
Оксигемоглобин						
Метгемоглобин (оксигемоглобин + феррицианид)						
Метгемоглобин (оксигемоглобин + воз-						
Дезоксигемоглобин						
Карбоксигемоглобин						

Сравнить полученные результаты с данными, приведенными в разделе *"Оптические свойства гемоглобина"*.

Охарактеризовать спектры поглощения различных форм гемоглобина, используя понятия, приведенные в разделе *"Спектры поглощения"*.

Сделать выводы о характере структурных изменений молекулы гемоглобина при воздействии различных факторов.

Для справок использовать разделы *"Оптические свойства гемоглобина" и "Спектры поглощения"*.

6. Определение светорассеяния в растворах оксигемоглобина (работа выполняется на КФК-2 (светофильтр №6)).

Изучить изменение светорассеяния в растворах оксигемоглобина, выдержанных в течение 1–4 суток при свободном доступе воздуха.

Определение светорассеяния в растворах оксигемоглобина проводится косвенным методом – по значению светопропускания контрольных (свежеприготовленных растворов) и опытных (выдержанных на воздухе) растворов оксигемоглобина. Следует помнить, что концентрация свежеприготовленного раствора должна равняться концентрации раствора оксигемоглобина до хранения его в течение указанного промежутка времени. Для компенсации светопоглощения за счет окрашенного пигмента к растворителю (воде) нужно добавить несколько капель концентрированного раствора бихромата калия, то есть необходимо уравнять светопропускание раствора оксигемоглобина и растворителя. По разнице значений светопропускания опытных и контрольных растворов судят об изменении светорассеяния в растворах оксигемоглобина при хранении в условиях свободного доступа воздуха. Если светорассеяние растворов оксигемоглобина при хранении увеличивается, то светопропускание его растворов должно при этом уменьшаться и наоборот.

Литература

1. Мецлер Д. Биохимия. М.: Мир, 1980.
2. Рубин А.Б. Биофизика. М.: Высшая школа, 1987.
3. Волькенштейн М.В. Биофизика. М.: Наука, 1981.